

DFW



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT
UNDER 37 CFR 1.55(a)

APPLICANT: Carlos Longo Areso DOCKET NO.: P04,0037
SERIAL NO.: 10/775,834 GROUP ART UNIT: 1761
FILING DATE: February 10, 2004 CONFIRMATION NO.: 1646
INVENTION: "ANTIMICROBIAL CASING"


Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

SIR:

Please enter in the record of the file of the above-identified application the attached Certified Copy of Spanish Patent Application 200300319, 10 February 2003, which was referred to in the Declaration of the above-identified application.

Applicant hereby claims the benefit of the filing date of 10 February 2003, which is the filing date of the attached German Application, in accordance with the provisions of 37 CFR 1.55 and 35 USC 119.

Submitted by,

 (Reg. No. 45,877)
Mark Bergner
SCHIFF HARDIN LLP
PATENT DEPARTMENT
6600 Sears Tower
Chicago, Illinois 60606-6473
(312) 258-5779
Attorney for Applicant(s)
CUSTOMER NUMBER 26574

THIS PAGE BLANK (USPTO)



CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as First Class Mail in an envelope addressed to:

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

on Oct. 22, 2004

Mark Bergner
Mark Bergner

THIS PAGE BLANK (USPTO)



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGIA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200300319, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 10 de Febrero de 2003.

Madrid, 8 de Marzo de 2004

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

CARMEN LENCE REIJA

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGIA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P200300319

03 FEB 10 11:49

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN CÓDIGO
MADRID 28

(1) MODALIDAD

☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD

- ☐ ADICIÓN A LA PATENTE
☐ SOLICITUD DIVISIONAL
☐ CAMBIO DE MODALIDAD
☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA
☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN:
MODALIDAD

NUMERO SOLICITUD
FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE(S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAÍS

DNI/CIF

CNAE

PYME

VISCOFAN, S.A.

ESPAÑOLA

ES

A31065501

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE

DOMICILIO Iturrama, 23 - Entreplanta

LOCALIDAD

PROVINCIA PAMPLONA

PAIS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑA

TELEFONO

FAX

CORREO ELECTRONICO

CÓDIGO POSTAL 31007

CÓDIGO PAÍS ES

CÓDIGO NACION ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAÍS

LONGO ARESO

CARLOS

ESPAÑOLA

ES

(8)

- ☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR
☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

- ☒ INVEN. LABORAL ☐ CONTRATO ☐ SUCESIÓN

(9) TÍTULO DE LA INVENCION

ENVOLTURA ANTIMICROBIANA

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:
PAIS DE ORIGEN

CÓDIGO PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES ☐

(15) AGENTE/REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLÉNSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)
CARPINTERO LOPEZ, FRANCISCO, 403/0, ALCALA, 35, MADRID, MADRID, 28014, ESPAÑA

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

- ☒ DESCRIPCIÓN. Nº DE PÁGINAS: 17
☒ Nº DE REVINDICACIONES: 2
☐ DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS:
☐ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS:
☒ RESUMEN
☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD
☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD
☒ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN
☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS DE SOLICITUD
☐ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA
☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS
☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN
☒ OTROS: DISKETTE CON MEMORIA

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

FRANCISCO CARPINTERO LOPEZ

(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN DE PAGO DE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oepm.es
www.oepm.es

C/ PANAMÁ, 1 • 28071 MADRID

MOD. 3101 - 1- EJEMPLAR PARA EL EXPEDIENTE

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

ENVOLTURA ANTIMICROBIANA

La invención proporciona el uso de extracto de lúpulo, extracto de lúpulo hidrogenado, alfa ácidos de lúpulo, beta ácidos de lúpulo, ácidos de lúpulo hidrogenados, derivados de los ácidos de lúpulo o sus resinas, cada uno de ellos por separado o en combinación de dos o más de ellos, en la superficie interna de una envoltura celulósica empleada en el embutido de productos cárnicos para evitar la aparición y desarrollo de bacterias gram positivas, especialmente del género *Listeria* en dichos productos cárnicos. Asimismo, la invención proporciona una envoltura celulósica para productos cárnicos recubierta internamente con una solución de los compuestos derivados del lúpulo mencionados; así como un producto cárnico para cuyo procesado se ha utilizado dicha envoltura celulósica. Por último, la invención proporciona un método para aplicar dicha solución a un producto cárnico.

GRÁFICO



12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

21 NÚMERO DE SOLICITUD

P200300519

31 NÚMERO

DATOS DE PRIORIDAD

32 FECHA

33 PAÍS

22 FECHA DE PRESENTACIÓN

10/02/2003

62 PATENTE DE LA QUE ES
DIVISORIA

71 SOLICITANTE (S)
VISCOFAN, S.A.

DOMICLIO Iturrama, 23 - Entreplanta

NACIONALIDAD ESPAÑA

72 INVENTOR (ES) CARLOS LONGO ARESO

51 Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

54 TÍTULO DE LA INVENCION
ENVOLTURA ANTIMICROBIANA

57 RESUMEN

ENVOLTURA ANTIMICROBIANA

La invención proporciona el uso de extracto de lúpulo, extracto de lúpulo hidrogenado, alfa ácidos de lúpulo, beta ácidos de lúpulo, ácidos de lúpulo hidrogenados, derivados de los ácidos de lúpulo o sus resinas, cada uno de ellos por separado o en combinación de dos o más de ellos, en la superficie interna de una envoltura celulósica empleada en el embutido de productos cárnicos para evitar la aparición y desarrollo de bacterias gram positivas, especialmente del género *Listeria* en dichos productos cárnicos. Asimismo, la invención proporciona una envoltura celulósica para productos cárnicos recubierta internamente con una solución de los compuestos derivados del lúpulo mencionados; así como un producto cárnico para cuyo procesado se ha utilizado dicha envoltura celulósica. Por último, la invención proporciona un método para aplicar dicha solución a un producto cárnico.

ENVOLTURA ANTIMICROBIANA

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere al campo de los productos cárnicos, concretamente al de productos cárnicos embutidos, y, más en particular, a métodos para evitar la aparición y desarrollo de bacterias en dichos productos
10 cárnicos.

Estado de la técnica anterior

Las bacterias del género *Listeria* y, concretamente las bacterias *Listeria monocytogenes*, constituyen uno de los
15 patógenos más peligrosos transmitidos por los alimentos. Según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), el porcentaje de hospitalizaciones en Estados Unidos debidas a infecciones por *Listeria* es el mayor causado por patógenos transmitidos por los alimentos, y es el segundo en
20 cuanto a mortalidad. Se estima que el 92% de los pacientes con listeriosis (enfermedad causada por la *Listeria*) requieren hospitalización y que un 20% fallece a causa de la misma.

Si bien la listeriosis es una enfermedad poco frecuente
25 en comparación con otras enfermedades causadas por otros patógenos transmitidos por los alimentos tales como *Salmonella* o *Campylobacter*, es, sin embargo, la enfermedad más grave y la que presenta mayores probabilidades de producir la muerte o un desenlace clínico grave. Hasta no hace mucho, se consideraba
30 que la listeriosis sólo afectaba a ciertos grupos de individuos: embarazadas, niños, ancianos y pacientes inmunodeficientes. Dentro de esta última categoría, los pacientes de más alto riesgo son aquellos con deficiencias en la funcionalidad de las células T, por ejemplo, receptores de

transplantes y pacientes con cáncer o SIDA. Sin embargo, ahora parece claro que el 30% de las listeriosis se da en individuos previamente sanos.

5 La contaminación por *L. monocytogenes* de los productos
cárnicos listos para comer se ha convertido en una de las más
preocupantes, ya que estos productos pueden haber sido
distribuidos ampliamente antes de detectar la contaminación de
los mismos causando grandes brotes epidémicos. Un ejemplo
10 conocido es el ocurrido entre agosto de 1998 y febrero de
1999, que causó 21 muertes (incluyendo seis abortos) y 100
personas enfermas en 22 estados diferentes de los Estados
Unidos. Los CDC identificaron la cepa de *L. monocytogenes*
responsable de este brote epidémico y la aislaron en
15 determinadas salchichas frankfurt así como en otros productos
cárnicos listos para comer.

Las salchichas frankfurt se elaboran habitualmente
rellenando de modo mecánico una envoltura artificial con una
20 emulsión de carne, reuniéndolas en porciones, coagulando la
carne mediante calentamiento, y ahumándolas quemando virutas
de madera o usando humo líquido. Los ciclos de temperatura
usados normalmente durante el procesado de las salchichas son
adecuados para eliminar la *L. monocytogenes* o cualquier otro
25 microorganismo contaminante. Sin embargo, y debido a que es
necesario pelar las salchichas frankfurt antes de envasarlas,
la superficie de las salchichas queda expuesta durante un
tiempo con lo que pueden contaminarse de nuevo.

30 La mayoría de los fabricantes de salchichas frankfurt se
enfrentan a este problema mediante la estrategia de
"obstáculos múltiples", por medio de un programa HACCP
(Análisis de riesgos de puntos críticos de control) adecuado y

unas prácticas de fabricación correctas, empleando aditivos antimicrobianos autorizados en las emulsiones de carne, garantizando la limpieza de las superficies usando los esterilizadores adecuados en las composiciones de limpieza, etc. Otro "obstáculo" en este contexto sería el uso de una envoltura "anti-listeria" en la fabricación de salchichas frankfurt, tal y como sugiere la patente US 5,573,797 o, más recientemente, la solicitud de patente PCT WO01/05254, en la que se describen composiciones para recubrimiento de películas, envolturas u otros materiales de envasado.

Brevemente, dicha envoltura consiste en una envoltura artificial elaborada con celulosa regenerada que contiene una o más sustancias (principalmente bacteriocinas) en su superficie interna, capaces de inhibir el crecimiento de la *L. monocytogenes*. Estas sustancias están en contacto con la superficie de la salchicha durante su fabricación y se transfieren a la misma durante su procesado y cocido. Esta transferencia es un paso esencial ya que la envoltura se elimina tras el cocido de la salchicha previamente a su envasado, con lo que el efecto protector de dicha envoltura podría perderse. Si se produjera cualquier contaminación por *Listeria* posterior a la eliminación de la envoltura, las bacteriocinas antimicrobianas sobre la superficie ejercerían dicha acción protectora.

Se sabe que las envolturas celulósicas transfieren los aditivos deseados durante el cocido. Envolturas celulósicas de este tipo se describen, por ejemplo, en Thor et al. Patente US 2,521,101).

En la solicitud de patente PCT WO00/38545 se describe una envoltura antimicrobiana que transfiere bacteriocinas con

propiedades antimicrobianas a la superficie de la salchicha, y en la solicitud de patente PCT WO01/05254 se reivindican envolturas, películas y otros materiales de envasado recubiertos con composiciones que contienen bacteriocinas.

Sería deseable disponer de otras envolturas con componentes antimicrobianos distintos de las bacteriocinas que se hayan usado históricamente en alimentos de un modo seguro.

10 Las bacteriocinas son buenos inhibidores de la *L. monocytogenes* y otras bacterias gram-positivas. Sin embargo, en opinión de los inventores existen razones para intentar evitar su uso:

15 i) En primer lugar, se requeriría un producto muy purificado para obtener envolturas antimicrobianas altamente activas. El uso de productos comerciales derivados de la fermentación de determinados sustratos en presencia de bacterias productoras de bacteriocina (principalmente
20 lácticas) conteniendo pequeñas cantidades de bacteriocinas muestra resultados muy pobres o limitados (véase, por ejemplo, la solicitud de patente PCT W000/38545 y la patente US 5,573,797).

25 ii) Otras desventajas importantes son las económicas (precios elevados comparados con el coste de la propia envoltura) y consideraciones legales (la nisina es la única bacteriocina permitida como aditivo alimentario, pero
30 solamente en determinados productos lácteos y no en productos cárnicos y de pollería tales como las salchichas).

Por último, existen células de *Listeria* resistentes a los efectos nocivos de las moléculas de bacteriocina. Se han descrito diversos mutantes resistentes a la nisina (véanse Harris et al., "Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to nisin", J Food Prot 1991, 54: 836-40; Ming & Daeschel, "Nisin resistance of foodborne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A", J Food Prot 1993, 56: 944-8; Davies & Adams, "Resistance of *Listeria monocytogenes* to the bacteriocin nisin", Int J Food Microbiol 1994, 21: 341-7; Song & Richard, "Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors", Int J Food Microbiol 1997, 36: 155-61; y Brandall & Montville, "Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype", Appl Environ Microbiol 1998, 64: 231-7). Se han descrito resistencias a otras bacteriocinas, tales como la mesenterocina 52, la curvaticina 13 y la plantaricina C19, así como resistencias cruzadas (Rekhif et al., "Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains", Curr Microbiol 1994, 28: 237-41). Cepas resistentes a la bavaricina muestran también resistencia a la pediocina (Rasch & Knochel, "Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A", Lett Appl Microbiol 1998, 27: 275-8), y se han descrito también resistencias cruzadas entre la nisina y las bacteriocinas de otros grupos diferentes (pediocina Ach y enterococina EFS2) (véase Song & Richard, 1997). Una observación que podría ser de particular importancia en aplicaciones cárnicas es que la presencia de cationes divalentes hace que la *Listeria* resistente a la nisina sea aún

más resistente a la acción de la nisina (véase Crandall & Montville, 1998).

En resumen, el riesgo de resistencia a las bacteriocinas es, en opinión de los inventores, el inconveniente más importante del uso de bacteriocinas en aplicaciones cárnicas; de hecho, es más importante que otras consideraciones de relevancia tales como cuestiones legales, problemas referentes a su aplicación práctica o cuestiones de etiquetado, entre otras.

Las flores femeninas de la viña del lúpulo (*Humulus lupulus*) se han usado históricamente para conferir aroma y amargar a la cerveza. A partir de estas flores se pueden obtener resinas cuyos constituyentes principales son de naturaleza ácida, principalmente alfa ácidos o humulonas (humulona, cohumulona y adhumulona) y beta ácidos o lupulonas (lupulona, colupulona y adlupulona). Ambos tipos de ácidos exhiben actividad antimicrobiana, si bien las bacterias gram-negativas y los hongos son menos sensibles a los efectos de los ácidos del lúpulo que las bacterias gram-positivas. (Haas, G.J. and Barsoumian, R.J., "Antimicrobial Activity of Hop Resins", Food Protec, 57: 59-61, 1994).

Aceites esenciales, oleoresinas (sin disolventes) así como extractos naturales (incluyendo destilados) del lúpulo se listan como compuestos GRAS (generalmente reconocidos como seguros) en los Reglamentos Federales de Estados Unidos (21 CFR 182.20).

30

En la industria cervecera se sabe desde hace tiempo que los ácidos del lúpulo contenidos en estos extractos son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos

responsables de la alteración de la cerveza tales como el *Lactobacillus*.

Los derivados hidrogenados de los ácidos del lúpulo
5 presentan también estas propiedades inhibitoras, tal y como lo
describen Todd y Guzinski (Patentes US 5,082,975 y 5,166,449),
quienes han mostrado que la hexahidrolupulona puede usarse
como un inhibidor selectivo del desarrollo y multiplicación de
células de *Lactobacillus* en presencia de levaduras. Otro
10 derivado, la tetrahydroisohumulona, se ha usado en pastas
dentífricas y en otras composiciones de higiene oral para
inhibir bacterias orales gram-positivas responsables de la
placa o de enfermedades periodontales, tal y como se describe
en Barney et al., patente US 5,370,863.

15 Los ácidos del lúpulo pueden inhibir también patógenos
transmitidos por los alimentos tales como la *Listeria*
monocytogenes, tal y como se describe en Millis y Schendel
(Patente US 5,286,506). En dicha patente se describe que los
20 beta ácidos en concentraciones de 6 ppm inhiben por completo
la *Listeria monocytogenes* en cultivos líquidos, y se
reivindica el uso en alimentos de beta ácidos 6-50 ppm (basado
en el peso total del alimento) capaces de inhibir el
crecimiento de la *L. monocytogenes* en dichos alimentos, siendo
25 6-15 ppm el intervalo de concentraciones preferido.

Barney et al., en la patente US 5,455,038 describe un
método para inhibir la *Listeria* usando cantidades efectivas de
tetrahydroisohumulona, hexahidrocolupulona o mezclas o sales,
30 para usar en alimentos sólidos y líquidos, carnes procesadas y
de pollería, y materiales de envoltura, si bien no se
mencionan específicamente las envolturas celulósicas.

Más recientemente, Johnson y Haas han descrito el uso de extractos de lúpulo útiles como agentes antibacterianos contra *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile* y *Helicobacter pylori* (patente US 6,251,461 y publicación de la solicitud de patente US 2001/0014365). Barney et al. han sugerido igualmente la utilidad de los ácidos del lúpulo para prevenir la contaminación por bacterias de las levaduras usadas habitualmente en la industria cervecera (patente US 6,326,185), mientras que Haas y Srinivasan han descrito el uso de extractos de lúpulo en un método eficaz para destruir protozoos indeseables (patente US 6,352,726).

Por último, King y Ming (solicitud PCT WO01/06877) describen también el uso de ácidos del lúpulo o derivados en combinación con uno o más tensioactivos no iónicos, quelantes, antioxidantes, y/o ácidos orgánicos útiles en la reducción o la eliminación de alteraciones o bacterias patógenas gram-positivas del género *Listeria* en alimentos y otros productos de consumo.

Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que el uso de una solución de componentes del lúpulo exenta de agentes antimicrobianos o agentes tensioactivos adicionales distintos de extractos vegetales en la superficie interna de una envoltura celulósica para productos cárnicos, evita la aparición y el desarrollo de bacterias gram positivas, en especial del género *Listeria* en dichos productos cárnicos.

Así pues, la presente invención supera un prejuicio del estado de la técnica, ya que en la solicitud internacional WO 01/06877 citada previamente se menciona que la presencia de componentes del lúpulo no es suficiente para evitar el

desarrollo de la *Listeria* en productos que contienen grasas tales como los productos cárnicos.

Además, el uso de extractos y derivados del lúpulo como agentes antimicrobianos para alimentos presenta una serie de ventajas adicionales con respecto a las bacteriocinas:

i) Los agentes antimicrobianos contenidos en extractos de lúpulo (o sus derivados hidrogenados) presentan un intervalo más amplio de microorganismos diana que las bacteriocinas.

ii) Asimismo, los extractos de lúpulo son compuestos GRAS y pueden ser económicamente más ventajosos ya que su producción es más sencilla y barata. Los extractos de lúpulo se pueden enriquecer fácilmente hasta concentraciones mayores de beta ácidos, mientras que la concentración de las bacteriocinas es mucho más compleja y cara.

iii) Por otro lado, los beta ácidos del lúpulo y sus derivados hidrogenados son moléculas muy pequeñas si se comparan con las bacteriocinas. Es bastante improbable que puedan causar problemas de alergenicidad; por otro lado, se han descrito escasas resistencias a estos agentes antimicrobianos. Por el contrario, la naturaleza peptídica de las bacteriocinas las hace más propensas a la alergenicidad, y se han documentado extensamente resistencias de la *Listeria* a estos agentes antimicrobianos.

Breve descripción de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar el uso de extracto de lúpulo, extracto de lúpulo hidrogenado, alfa ácidos de lúpulo, beta ácidos de lúpulo, ácidos de lúpulo hidrogenados, derivados de los ácidos de lúpulo o sus resinas, cada uno de ellos por separado o en combinación de dos o más de ellos, en la superficie interna de una envoltura celulósica empleada en el embutido de productos cárnicos para evitar la aparición y desarrollo de bacterias gram positivas, en especial del género *Listeria* en dichos productos cárnicos.

10

Asimismo, la presente invención proporciona una envoltura celulósica para productos cárnicos recubierta internamente con una solución de los compuestos derivados del lúpulo mencionados; así como un producto cárnico para cuyo procesado se ha utilizado dicha envoltura celulósica.

15

Por último, la presente invención proporciona también un método para aplicar dicha solución a un producto cárnico.

20 **Descripción detallada de la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar el uso de extracto de lúpulo, extracto de lúpulo hidrogenado, alfa ácidos de lúpulo, beta ácidos de lúpulo, ácidos de lúpulo hidrogenados, derivados de los ácidos de lúpulo o sus resinas, cada uno de ellos por separado o en combinación de dos o más de ellos, en la superficie interna de una envoltura celulósica empleada en el embutido de productos cárnicos para evitar la aparición y desarrollo de bacterias gram positivas, en especial del género *Listeria* en dichos productos cárnicos.

25

Tal y como se ha descrito previamente, los extractos y compuestos derivados del lúpulo presentan propiedades antimicrobianas que pueden usarse para evitar el desarrollo de

30

microorganismos contaminantes superficiales sobre productos alimentarios y, más concretamente, sobre productos cárnicos. Dichos componentes del lúpulo se pueden aplicar en la envoltura usada para embutir productos cárnicos y que se encuentra en contacto con dicho producto cárnico para una mejor transferencia del efecto de los mismos.

En una realización particular, los componentes del lúpulo mencionados se incluyen en una envoltura para la elaboración de salchichas frankfurt. Dichos componentes del lúpulo se transfieren de la envoltura a la superficie de la salchicha frankfurt confiriendo a dicha superficie sus propiedades antimicrobianas. De este modo, se evita una contaminación no deseada por microorganismos superficiales, especialmente de Listeria, que podría causar las enfermedades transmitidas por los alimentos descritas previamente.

Asimismo, otro objeto de la invención es proporcionar una envoltura celulósica para productos cárnicos recubierta internamente con una solución que contiene al menos un componente seleccionado entre: extracto de lúpulo, extracto de lúpulo hidrogenado, alfa ácidos de lúpulo, beta ácidos de lúpulo, ácidos de lúpulo hidrogenados y derivados de los ácidos de lúpulo o sus resinas, caracterizada porque la solución está libre de agentes antimicrobianos adicionales distintos de extractos vegetales.

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un producto cárnico para cuyo procesado se ha utilizado la envoltura celulósica previamente descrita.

En una realización particular de la invención, dicho producto cárnico contiene de 50 a 500 ppm de extracto de

lúpulo, extracto de lúpulo hidrogenado, alfa ácidos de lúpulo, beta ácidos de lúpulo, ácidos de lúpulo hidrogenados, derivados de los ácidos de lúpulo o sus resinas o sus mezclas, cada uno de ellos por separado o en combinación de dos o más de ellos.

En otra realización particular de la invención, dicho producto cárnico contiene 50 a 100 ppm de extracto de lúpulo, extracto de lúpulo hidrogenado, alfa ácidos de lúpulo, beta ácidos de lúpulo, ácidos de lúpulo hidrogenados, derivados de los ácidos de lúpulo o sus resinas o sus mezclas, cada uno de ellos por separado o en combinación de dos o más de ellos.

En otra realización particular de la invención, dicho producto cárnico contiene cualquier composición cárnica, la cual puede haber sido sometida o no a un proceso adicional de ahumado.

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para aplicar a un producto cárnico una solución que contiene al menos un componente seleccionado entre: extracto de lúpulo, extracto de lúpulo hidrogenado, alfa ácidos de lúpulo, beta ácidos de lúpulo, ácidos de lúpulo hidrogenados y derivados de los ácidos de lúpulo o sus resinas, y que está exenta de agentes antimicrobianos adicionales distintos de extractos vegetales, caracterizado dicho método porque comprende las siguientes etapas:

- a) aplicar la solución al interior de una envoltura celulósica
- b) embutir la envoltura celulósica con emulsión de carne,
- c) calentar y opcionalmente ahumar el producto cárnico preparado en la etapa a) de tal manera que dicha solución se transfiere a la superficie de la carne, y

d) opcionalmente retirar la envoltura celulósica del producto cárnico.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo I.

Un extracto de lúpulo comercial de S. S. Steiner, Inc. que contenía beta ácidos de lúpulo al 10%, se mezcló con un 40% de glicerina. Típicamente, este extracto de beta ácidos tiene la siguiente composición: 50% de colupulona, 35% de lupulona y 15% de adlupulona, y no contiene ningún beta ácido hidrogenado. La solución resultante se pulverizó en el interior de una envoltura celulósica durante el proceso de fruncido; se elaboraron las salchichas frankfurt con esta envoltura y se compararon con salchichas frankfurt elaboradas con una envoltura estándar. La concentración final estimada de beta ácidos de lúpulo era de 55 ppm referida al peso de la salchicha frankfurt.

Las salchichas frankfurt se prepararon en las instalaciones de Viscofan. Se llevó a cabo un ciclo de horno normal sin humo añadido, y las salchichas sin pelar se transportaron inmediatamente a los laboratorios. Otras salchichas de control se pelaron y pesaron para calcular el peso promedio a fin de ajustar el nivel de inoculación de *Lm* (*Listeria monocytogenes*).

La inoculación se estableció a 50 CFU/g. Este es un nivel muy bajo que obliga al uso de técnicas del número más probable (MPN). Todos los procedimientos descritos a continuación se llevaron a cabo en condiciones estériles.

Tras pelar y eliminar la envoltura de las salchichas, se inocularon inmediatamente con *Lm* a 50 CFU/g. El inóculo se extendió cuidadosamente por medio de una torunda de algodón estéril, y las salchichas se envasaron por triplicado (es decir, tres salchichas con el mismo tratamiento) en una bolsa de plástico sellada, y se mantuvieron a 2-4 °C hasta el recuento de las colonias. Este inóculo inicial se estimó también mediante técnicas MPN, tal y como se explica en los párrafos siguientes.

10

Tras el periodo de incubación (normalmente al cabo de 0, 1, 4, 7, 15, 30 y 70 días), se introdujo cada salchicha en una bolsa de Stomacher junto con 360 ml de BPW (agua de peptona tamponada), y se homogeneizó en un Stomacher durante 30 segundos.

15

El líquido obtenido se diluyó en series 1/10 en caldo de peptona (el número de diluciones depende del tiempo de incubación y de los resultados obtenidos previamente).

20

Los recuentos se realizaron usando métodos MPN: se usaron 9 tubos de caldo demi-Fraser; tres se inocularon con 1 ml de dilución 10-1, tres con 1 ml de dilución 10-2 y tres con 1 ml de dilución 10-3. Los tubos se incubaron a 31 ± 1 °C durante 48 horas y se dispusieron en placas de agar Palcam. Los tubos en los que se obtuvieron colonias de *Lm* se consideraron como positivos, y se calculó el MPN usando las combinaciones positivo-negativo en las tablas MPN.

25

Análogamente, se prepararon las salchichas frankfurt con la envoltura estándar también en las instalaciones de Viscofan, tal y como se ha explicado anteriormente.

30

Tras pelar y eliminar la envoltura de las salchichas, se inocularon con 100 µl de Lm hasta alcanzar una concentración final de 50 CFU/g, tal y como se ha descrito previamente.

Tras el periodo de incubación, cada salchicha se homogeneizó en el Stomacher y se llevó a cabo el recuento de Listeria tal y como se ha explicado anteriormente.

El desarrollo de Listeria se inhibió en las salchichas frankfurt elaboradas con la envoltura que contenía los ácidos de lúpulo, en comparación con las salchichas frankfurt con envoltura estándar, tal y como se muestra en la Tabla I.

Tabla I. Inhibición de *L. monocytogenes* en las salchichas del Ejemplo I mantenidas a 2°C

	<i>L.m.</i> (CFU/g salchicha)					
	Día 0	2	7	15	30	70
Envoltura estándar	33	110	320	3600	20000	2000000
Envoltura de la invención	33	18	34	400	580	87000

Ejemplo II.

Un extracto hidrogenado de lúpulo comercial de S. S. Steiner, Inc., que contenía alfa ácidos de lúpulo tetraiso-hidrogenados al 10%, se mezcló con un 40% de glicerina. La solución resultante se pulverizó en el interior de una envoltura celulósica durante el proceso de fruncido; se elaboraron las salchichas frankfurt con esta envoltura y se compararon con salchichas frankfurt elaboradas con una envoltura estándar. La concentración final estimada de derivados hidrogenados de ácidos del lúpulo era de 55 ppm referida al peso de la salchicha frankfurt.

Las salchichas inoculadas se prepararon del mismo modo que en el Experimento I.

El desarrollo de *Listeria* se inhibió en las salchichas frankfurt elaboradas con la envoltura que contenía ácidos del lúpulo, en comparación con las salchichas frankfurt con envoltura estándar, tal y como se muestra en la Tabla II.

Tabla II. Inhibición de *L. monocytogenes* en las salchichas del Ejemplo II mantenidas a 2°C

	L.m. (CFU/g salchicha)					
	Día 0	2	7	15	34	
Envoltura estándar	109	170	66000	8600000	1400000000	
Envoltura de la invención	109	29	14000	240000	340000000	

Reivindicaciones

1. Uso de extracto de lúpulo, extracto de lúpulo hidrogenado, alfa ácidos de lúpulo, beta ácidos de lúpulo, ácidos de lúpulo hidrogenados, derivados de los ácidos de lúpulo o sus resinas, cada uno de ellos por separado o en combinación de dos o más de ellos, en la superficie interna de una envoltura celulósica empleada en el embutido de productos cárnicos para evitar la aparición y desarrollo de bacterias gram positivas en dichos productos cárnicos.
2. Uso según la reivindicación 1 para evitar la aparición y desarrollo de bacterias del género *Listeria* en dichos productos cárnicos.
3. Envoltura celulósica para productos cárnicos recubierta internamente con una solución que contiene al menos un componente seleccionado entre: extracto de lúpulo, extracto de lúpulo hidrogenado, alfa ácidos de lúpulo, beta ácidos de lúpulo, ácidos de lúpulo hidrogenados y derivados de los ácidos de lúpulo o sus resinas, caracterizada porque la solución está libre de agentes antimicrobianos adicionales distintos de extractos vegetales.
4. Producto cárnico para cuyo procesado se ha utilizado una envoltura celulósica según la reivindicación 3.
5. Producto cárnico según la reivindicación 4 caracterizado porque contiene de 50 a 500 ppm de extracto de lúpulo, extracto de lúpulo hidrogenado, alfa ácidos de lúpulo, beta ácidos de lúpulo, ácidos de lúpulo hidrogenados, derivados de los ácidos de lúpulo o sus resinas o sus mezclas, cada

uno de ellos por separado o en combinación de dos o más de ellos.

6. Producto cárnico embutido según la reivindicación 4 caracterizado porque contiene de 50 a 100 ppm de extracto de lúpulo, extracto de lúpulo hidrogenado, alfa ácidos de lúpulo, beta ácidos de lúpulo, ácidos de lúpulo hidrogenados, derivados de los ácidos de lúpulo o sus resinas o sus mezclas, cada uno de ellos por separado o en combinación de dos o más de ellos.

7. Producto cárnico según las reivindicaciones 4-6 caracterizado porque contiene cualquier composición cárnica, la cual puede haber sido sometida o no a un proceso adicional de ahumado.

8. Método para aplicar a un producto cárnico una solución que contiene al menos un componente seleccionado entre: extracto de lúpulo, extracto de lúpulo hidrogenado, alfa ácidos de lúpulo, beta ácidos de lúpulo, ácidos de lúpulo hidrogenados y derivados de los ácidos de lúpulo o sus resinas, y que está exenta de agentes antimicrobianos adicionales distintos de extractos vegetales, caracterizado dicho método porque comprende las siguientes etapas:

a) aplicar la solución al interior de una envoltura celulósica

b) embutir la envoltura celulósica con emulsión de carne,

c) calentar y opcionalmente ahumar el producto cárnico preparado en la etapa a) de tal manera que dicha solución se transfiere a la superficie de la carne, y

d) opcionalmente retirar la envoltura celulósica del producto cárnico.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**SPANISH PATENT
AND
TRADEMARKS**

OFFICIAL CERTIFICATE

I hereby certify that the attached documents are an exact copy of PATENT INVENTION Application number 200300319 as filed before this Office, on 10 February 2003.

Madrid, 8 March 2004

The Director of the Department of
Patents and Technology Information
P.D.

(Signature)

CARMEN LENCE REIJA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SPANISH PATENT AND TRADEMARKS
OFFICE

APPLICATION FOR

(1) MODALITY

☒ PATENT OF INVENTION

☐ UTILITY MODEL

- (2)
- ☒ ADDITION APPLICATION
- ☐ DIVISIONAL APPLICATION
- ☐ CHANGE IN MODALITY
- ☐ EUROPEAN TRANSFORMATION APPLICATION
- ☐ PCT: ENTRY INTO NATIONAL PHASE
- (3) MAIN FILE OR FILE OF ORIGIN
- MODALITY
- APPLICATION NUMBER
- APPLICATION DATE

APPLICATION NUMBER

P200300319

FILING DATE AND TIME IN S.P.T.O.

10 FEBRUARY 2003 ; 11:49

FILING DATE AND TIME IN PLACE OTHER THAN S.P.TO.

(4) FILING PLACE

CODE

MADRID

28

(5) APPLICANT(S): SURNAME OR COMPANY NAME

FORENAME

NATIONALITY

COUNTRY
CODE

SPANISH ID. NO.

VISCOFAN, S.A.

SPANISH

ES

A31065501

(6) PARTICULARS OF FIRST APPLICANT

ADDRESS Iturrama, 23-Entreplanta
TOWN

FAX

TELEPHONE

PROVINCE PAMPLONA

POST CODE 31007

COUNTRY OF RESIDENCE

SPAIN

COUNTRY CODE

ES

NATIONALITY

SPANISH

NATION CODE

ES

(7) INVENTORS

SURNAMES

NAMES

NATIONALITY

CODE

LONGO ARESO

CARLOS

SPANISH

ES

(8)

☐ THE APPLICANT IS THE INVENTOR

☒ THE APPLICANT IS NOT THE INVENTOR OR SOLE INVENTOR

(9) MANNER THE RIGHT WAS OBTAINED

☒ LABOUR INV.

☐ CONTRACT

☐ INHERITANCE

(10) TITLE OF THE INVENTION

ANTIMICROBIAL CASING

(11) INVENTION RELATES TO A MICROBIOLOGICAL PROCESS

☐ YES

☒ NO

(12) OFFICIAL EXHIBITIONS: PLACE

DATE

(13) PRIORITY STATEMENTS:

COUNTRY OF ORIGIN

COUNTRY CODE

NUMBER

DATE

(14) APPLICANT SEEKS FEES PAYMENT EXEMPTION UNDER PATENT ACT ARTICLE 162 P.L.

YES ☐

NO ☒

(15) AGENT/REPRESENTATIVE: NAME, ADDRESS (NAME AND CODE)

CARPINTERO LOPEZ, FRANCISCO, 403/0, ALCALA,35, MADRID, MADRID, 28014, SPAIN

(16) SCHEDULE OF ATTACHEMENTS

☒ DESCRIPTION NO. PAGES 17

☒ CLAIMS NO. PAGES 2

☐ DRAWINGS NO. PAGES

☒ ABSTRACT

☐ PRIORITY DOCUMENT

☐ TRANSLATION OF THE PRIORITY DOCUMENT

☒ REPRESENTATION DOCUMENT

☒ RECEIPT OF PAYMENT OF FEES

☐ COMPLEMENTARY INFORMATION SHEET

☐ SAMPLES

☒ OTHERS: DISKETE WITH MEMORY

OFFICER'S SIGNATURE

(Signature illegible)

SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

(Signature illegible)

NOTIFICATION OF PAYMENT OF GRANT FEE

This application shall be deemed as withdrawn if the grant fee is not paid; a term of three months is available for payment thereof from the publication of the notice of grant in the Official Industrial Property Bulletin (BOPI), plus ten days as laid down in article 81 Royal Decree 10-10-86

THE DIRECTOR OF THE SPANISH PATENT AND TRADEMARK OFFICE

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT

ABSTRACT AND DRAWING

APPLICATION NO.

200300319

FILING DATE

ABSTRACT (Maximum 150 words)

ANTIMICROBIAL CASING

The invention corresponds to application of a hop extract, hydrogenated hop extract, hop alpha acids, hop beta acids, hydrogenated hop acids, derivatives of hop acids or their resins, each separately or in combinations of two or more, on the inside surface of a cellulosic casing used in sausage manufacture to prevent the appearance and growth of gram-positive bacteria especially of the genus *Listeria* in these meat products. Similarly, the invention also provides a cellulosic casing for meat products coated internally with a solution of the hop derivatives mentioned; and a meat product produced using this cellulosic casing. Finally, the invention provides a method to apply this solution to a meat product.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT INVENTION APPLICATION

SPANISH PATENT AND TRADEMARK OFFICE	(31) NUMBER (32) DATE (33) COUNTRY			A1	(12) PATENT OF INVENTION
					(21) APPLICATION NUMBER P200300319
					(22) FILING DATE 10/02/2003
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> (71) APPLICANT (S) NATIONALITY </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 10px;"> VISCOFAN, S.A. SPANISH </div> <div style="margin-top: 10px;"> ADDRESS ITURRAMA, 23- ENTREPLANTA </div>					
(72) INVENTOR (S) CARLOS LONGO ARESO					
(51) Int. Cl.				DIAGRAM: <div style="height: 150px; border: 1px solid black; margin-top: 10px;"></div>	
(54) TITLE OF INVENTION: ANTIMICROBIAL CASING					
(57) ABSTRACT (VOLUNTARY, WITHOUT ANY LEGAL VALUE) <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> ANTIMICROBIAL CASING </div> <p style="margin-top: 10px;"> The invention corresponds to application of a hop extract, hydrogenated hop extract, hop alpha acids, hop beta acids, hydrogenated hop acids, derivatives of hop acids or their resins, each separately or in combinations of two or more, on the inside surface of a cellulosic casing used in sausage manufacture to prevent the appearance and growth of gram-positive bacteria especially of the genus <i>Listeria</i> in these meat products. Similarly, the invention also provides a cellulosic casing for meat products coated internally with a solution of the hop derivate mentioned; and a meat product produced using this cellulosic casing. Finally, the invention provides a method to apply this solution to a meat product. </p>					

FIRST PAGE OF THE SPECIFICATION

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ANTIMICROBIAL CASING

Area of the technique

5 The present invention refers to meat products, more specifically to sausages, and more specifically to methods to prevent the appearance and growth of bacteria in these meat products.

State of the art of the technique

10 Bacteria of the genus *Listeria* and, more specifically, the bacteria *Listeria monocytogenes*, are among the most dangerous food-borne pathogens. According to the Centers for Disease Control (CDC), there are more hospital admissions due to infections by *Listeria* than by any other food-borne pathogen and it is the second cause of food-borne pathogen related mortality. It has been estimated that around 92% of patients with listeriosis (the disease caused by *Listeria*) require hospitalization and that 20% of these
15 result in death.

20 Although listeriosis is a relatively rare disease compared with other diseases caused by other food-borne pathogens such as *Salmonella* or *Campylobacter*, it is, however, the most serious illness and the one most likely to result in death or in a severe clinical outcome. Until recently it was thought that listeriosis only affected some population groups such as: pregnant women, children, the elderly and immunocompromised patients. Within this latter category, the highest risk patients are those with
25 deficiencies in T cells functionality, for example, transplant recipients and patients with cancer or AIDS. However, it appears now that 30% of cases of listeriosis occur in previously healthy individuals.

30 Contamination of meat products for human consumption by *L. monocytogenes* is one of the most alarming types of food poisoning since these products may have been widely distributed before their contamination is detected, causing large epidemic outbreaks. One example of this is the outbreak that occurred between August 1998 and February 1999, which caused 21 deaths (including six abortions) and affected 100 individuals in 22
35 States of the United States. The CDC identified the strain *L. monocytogenes*

THIS PAGE BLANK (USPTO)

as being responsible for this epidemic outbreak, which was isolated in some frankfurter sausages and in other precooked meat products.

5 Frankfurter sausages are usually made by mechanically filling an artificial casing with a meat paste, the meat is separated into portions, it is coagulated by heat treatment and smoked using burning wood chips or liquid smoke. The temperature cycles normally used during sausage manufacture are sufficient to eliminate *L. monocytogenes* or any other contaminating microorganism. However, since the casing of the frankfurter sausages must
10 be removed before these are packaged, the surface of the sausage is exposed for some time and can, therefore, be contaminated again.

Most frankfurter manufacturers tackle this problem by the "multiple obstacle" strategy by applying a suitable program of Hazard Analysis of
15 Critical Control Points (HACCP) using antimicrobial additives approved for meat pastes, guaranteeing adequate cleaning of the surfaces using appropriate sterilizing agents in the cleaning products etc. Another "obstacle" in this context would be to use an "anti-listeria" casing in the frankfurter sausage manufacture as suggested by the US patent 5,573,797 or, more
20 recently, the patent application PCT WO01/05254, in which compositions are described to coat films, casings or other packaging materials.

Briefly, this casing consists of an artificial casing made from regenerated cellulose that contains one or more substances (mainly
25 bacteriocins) on its internal surface, capable of inhibiting growth of *L. monocytogenes*. These substances are in contact with the surface of the sausage during the manufacturing process and are transferred to it during processing and cooking. This transferal is an essential step since the casing is eliminated after cooking the sausage before it is packaged, thus the
30 protective effect of this casing can be lost. If contamination by *Listeria* takes place after the casing has been eliminated, the antimicrobial bacteriocins exert a protective action on the surface of the sausage.

It is known that cellulosic casings transfer the desired additives during
35 the cooking process. Cellulosic casings of this type are described, for

THIS PAGE BLANK (USPTO)

example, in Thor et al. US Patent 2,521,101).

5 In patent application PCT WO00/38545, an antimicrobial casing is described that transfers bacteriocins with antimicrobial properties to the surface of the sausage and in patent application PCT WO01/05254 claims are made for casings, films, and other packaging materials coated with compositions that contain bacteriocins.

10 It would be advantageous to have at our disposal other packaging with different antimicrobial components of bacteriocins that have been used safely in the past in food products.

15 Bacteriocins are good inhibitors of *L. monocytogenes* and other gram-positive bacteria. However, the inventors consider that there are several reasons to avoid their use:

20 i) Firstly, a highly purified product is required to obtain highly active antimicrobial casings. The use of commercial derivatives of the fermentation of certain substrates in the presence of bacteriocin-producing bacteria (mainly lactic acid bacteria) containing small amounts of bacteriocins has given very poor or limited results (see, for example, patent application PCT WO00/38545 and the US patent 5,573,797).

25 ii) Other important drawbacks are economic ones (high costs compared with the cost of the casing itself) and legal considerations (nisine is the only bacteriocin permitted as a food additive, but only in some milk products and not in meat or chicken products such as sausages).

30 Finally, some *Listeria* strains are resistant to the effects of the bacteriocin molecules. Several mutant strains with resistance against nisin have been described (see Harris *et al.*, "Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to nisin", J Food Prot 1991, 54: 836-40; Ming & Daeschel, "Nisin resistance of food-borne bacteria and the specific resistance responses of *Listeria monocytogenes* Scott A", J
35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Food Prot 1993, 56: 944-8; Davies & Adams, "Resistance of *Listeria monocytogenes* to the bacteriocin nisin", Int J Food Microbiol 1994, 21: 341-7; Song & Richard, "Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors", Int J Food Microbiol 1997, 36: 155-61; y Crandall & Montville, "*Nisin resistance in Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype", Appl Environ Microbiol 1998, 64: 231-7). Resistances have also been described to other bacteriocins, such as mesenterocin 52, curvaticin 13 and plantaricin C19, and crossed resistances (Rekhif *et al.*, "Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains", Curr Microbiol 1994, 28: 237-41). Strains resistant to bavaricin also show resistance to pediocin (Rasch & Knochel, "*Variations in tolerance of Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A", Lett Appl Microbiol 1998, 27: 275-8), and crossed resistances have also been described between nisin and other different bacteriocin groups pediocin ACh and enterococin EFS2) (see Song & Richard, 1997). One observation that could be of special relevance in meat products is that the presence of divalent cations enhances the resistance of *Listeria* resistant to nisin (see Crandall & Montville, 1998).

In summary, the risk of resistance to the bacteriocins is, in the inventors' opinions, the most important drawback to the use of bacteriocins in meat products. In fact, it is more important than other factors such as legal considerations, problems relating to their practical application or related to labeling, among others.

The female flowers of the hop vine (*Humulus lupulus*) have been historically used to give beer its characteristic aroma and bitterness. Resins can be obtained from these flowers of which the main constituents are acidic, mainly alpha acids or humulons (humulon, cohumulon and adhumulon) and beta acids or lupulons (lupulon, colupulon and adlupulon). Both types of acids exhibit antimicrobial activity although gram-negative bacteria and fungi are less sensitive to the effects of hop acids than gram-positive bacteria. (Haas, G.J. and Barsoumian, R.J., Antimicrobial Activity of Hop Resins",

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Food Protec, 57: 59-61, 1994).

5 Essential oils, oleoresins (without solvents) and natural extracts
(including distilled ones) of the hop are listed as GRAS compounds
(generally recognized as safe) in the United States Federal Regulations (21
CFR 182.20).

10 In the beer industry it has been known for some time that hop acids
contained in these extracts can inhibit the growth of microorganisms
responsible for altering beer such as *Lactobacillus*.

15 Hydrogenated derivatives of hop acids also present these inhibitory
properties as described by Todd and Guzinski (US Patents 5,082,975 and
5,166,449), who have shown that hexahydrolupulon can be used as a
selective inhibitor of the development and growth of *Lactobacillus* cells in the
presence of yeast. Another derivative, tetrahydroisohumulon, has been used
in toothpastes and other oral hygiene products to inhibit gram-positive oral
bacteria responsible for plaque formation or periodontal diseases, as
described in Barney *et al.*, US patent 5,370,863.

20 Hop acids can also inhibit food-borne pathogens such as *Listeria*
monocytogenes, as described in Millis and Schendel (US Patent 5,286,506).
This patent describes that beta acids in concentrations of 6 ppm completely
inhibit *Listeria monocytogenes* in liquid cultures and they claim the use in
25 food products of beta acids at 6-50 ppm (based on total weight of food
product) capable of inhibiting the growth of *L. monocytogenes* in these food
products where 6-15 ppm is the preferred concentration range.

30 Barney *et al.*, in the US patent 5,455,038, describes a method to
inhibit *Listeria* using effective amounts of tetrahydroisohumulon,
hexahydrocolupulon or mixtures or salts, for use in solid and liquid products,
processed meats and chicken products, although they do not specifically
mention cellulosic casings.

35 More recently, Johnson and Haas described the use of hop extracts as

THIS PAGE BLANK (USPTO)

antimicrobial agents against *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile* and *Helicobacter pylori* (US patent 6,251,461 and publication of the US patent application 2001/0014365). Barney *et al.* have also suggested the use of these hop acids to prevent bacterial contamination of the yeasts usually used in the beer industry (US patent 6,326,185), while Haas and Srinivasan described the use of hop extracts in an effective method to destroy undesirable protozoa (US patent 6,352,726).

Finally, King and Ming (application PCT WO01/06877) also described the use of hop acids or derivatives combined with the use of one or more non-ionic surfactants, chelating agents, antioxidants and/or organic acids useful at reducing or eliminating alterations in gram-positive pathogenic bacteria of the genus *Listeria* in foods and other consumable goods.

Surprisingly, the present inventors have discovered that the application of a solution of hop components without additional antimicrobial agents or surfactants other than plant extracts on the internal surface of a cellulosic casing for meat products, prevents the appearance and growth of gram-positive bacteria, especially of the genus *Listeria* in these meat products.

Therefore, the present invention overcomes a previous preconception in the state of the art of the technique, since the international patent application WO 01/06877 cited previously mentions that the presence of hop components is not sufficient to prevent the development of *Listeria* in fatty foods such as meat products.

Moreover, the use of hop extracts and derivatives as antimicrobial agents in food products represents a series of additional benefits compared to the use of bacteriocins.

- i) The antimicrobial agents contained in hop extracts (or their hydrogenated derivatives) present a wider range of target microorganisms than bacteriocins.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- ii) Also, hop extracts are GRAS compounds and can be economically more viable since they are simple and cheap to produce. Hop extracts can easily be enriched to have a higher beta acids contents, while it is much more expensive and complicated to concentrate bacteriocins.
- 5
- iii) On the other hand, hop beta acids and their hydrogenated derivatives are very small molecules compared with bacteriocins. They are unlikely to cause problems of allergenicity and few resistances have been described to these antimicrobial agents. In contrast, the peptidic nature of bacteriocins makes them more susceptible to allergenicity and many resistant strains of *Listeria* to these antimicrobial agents have been documented.
- 10

Brief description of the invention

15 The objective of the present invention is to provide a use for hop extract, hydrogenated hop extract, hop alpha acids, hop beta acids, hydrogenated hop acids, hop acid derivatives or their resins, each separately or in combinations of two or more, on the internal surface of a cellulosic casing used in the manufacture of sausages to prevent the appearance and development of gram-positive bacteria, especially of the genus *Listeria* in these meat products.

20

The present invention also provides a cellulosic casing for meat products that is internally coated with a solution of compounds derived from the above mentioned hop and also a meat product in which this cellulosic casing has been used.

25

Finally, the present invention also provides a method to apply this solution to a meat product.

30

Detailed description of the invention

One objective of the present invention is to provide application of hop extract, hydrogenated hop extract, hop alpha acids, hop beta acids, hydrogenated hop acid derivatives or their resins, each separately or in combinations of two or more of them, on the inside surface of a cellulosic

35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

casing used in meat products to prevent the appearance and development of Gram-positive bacteria, especially of the genus *Listeria* in these meat products.

5 As described previously, the extracts and compounds derived from the hop present antimicrobial properties that can be used to prevent the development of contaminating microorganisms on the surface of food products and, more specifically, on meat products. These hop components can be applied to the casing used to make sausages that is in contact with
10 the meat product to optimize transferal of the effect of these components to the meat.

15 In one specific application, the hop components mentioned are included in a casing to make frankfurter sausages. These hop components are transferred from the casing to the surface of the frankfurter sausage conferring their antimicrobial properties to its surface. This prevents contamination by unwanted surface microorganisms, especially by *Listeria*, that could cause the previously described food-borne diseases.

20 Similarly, another objective of this invention is to provide a cellulosic casing for meat products internally coated with a solution that contains at least one component selected from among: hop extract, hydrogenated hop extract, hop alpha acids, hop beta acids, hydrogenated hop acids, and derivatives of hop acids or their resins, characterized because the solution is
25 free from additional antimicrobial agents other than plant extracts.

30 Another additional objective of the present invention is to provide a meat product that has been manufactured using the previously described cellulosic casing.

35 In one specific application of the invention, this meat product contains between 50 and 500 ppm of hop extract, hydrogenated hop extract, hop alpha acids, hop beta acids, hydrogenated hop acids, derivatives of hop acids or their resins or mixtures, each separately or two or more of them together.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

In another specific application of the invention, this meat product contains 50 to 100 ppm of hop extract, hydrogenated hop extract, hop alpha acids, hop beta acids, hop acid derivatives or their resins or mixtures, each separately or combining together two or more of them.

5

In one specific application of the invention, this meat product contains any meat composition, either treated or not with an additional smoking process.

10

Another objective of the present invention is to provide a method to apply to a meat product a solution that contains at least one component selected from among: hop extract, hydrogenated hop extract, hop alpha acids, hop beta acids, hydrogenated hop acids and derivatives of hop acids or their resins and that this is devoid of antimicrobial agents other than plant extracts. This method is characterized by consisting of the following steps:

15

- a) application of the solution to the inside of a cellulosic casing.
- b) filling the cellulosic casing with meat paste,
- c) heating and, optionally, smoking the meat product prepared in step a) so that this solution is transferred to the surface of the meat, and
- d) optionally, removing the cellulosic wrapping from the meat product.

20

The following examples are merely illustrative of the invention and in no way limit its application.

25

Example I.

A commercial liquid extract of S. S. Steiner, Inc. that contains 10% hop beta acids was mixed with 40% glycerin. This beta acid extract usually has the following composition: 50% colupulon, 35% lupulon and 15% adlupulon, and does not contain any hydrogenated beta acid. The resulting solution was sprayed on the interior of a cellulosic casing during the gathering process; the frankfurter sausages were made with this casing and compared with frankfurters made with a standard casing. The estimated final concentration of hop beta acids was 55 ppm relative to the weight of the frankfurter sausage.

30

35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Frankfurter sausages were prepared in Viscofan installations. A normal oven treatment cycle was used without smoke treatment and the unskinned sausages were immediately transported to the laboratories. Other control sausages were skinned and weighed to estimate the mean weight to adjust the level of *Lm* inoculation (*Listeria monocytogenes*).

Inoculation was established at around 50 CFU/g. Owing to this very low level of inoculation we had to use the Most Probable Number technique (MPN). All the processes described below were carried out in sterile conditions.

After skinning the sausages and removing the casing, they were immediately inoculated with *Lm* at 50 CFU/g. The inoculum was carefully spread using a sterile cotton wool ball and the sausages were packed in triplicate (i.e. every three sausages received an identical treatment) in a sealed plastic bag, and were kept at 2-4 °C until the colonies were counted. This initial inoculum was also estimated by MPN techniques as explained in the following paragraph.

After the incubation period, (normally at 0, 2, 4, 7, 15, 30 and 70 days), each sausage was placed in a Stomacher bag together with 360 ml of BPW (buffered peptone water), and homogenized in a Stomacher for 30 seconds.

The liquid obtained was diluted in 1/10 series in peptone broth (the number of dilutions depends on the incubation time and the results obtained previously).

Recounts were done using the MPN method: 9 tubes of demi-Fraser broth were used; three were inoculated with 1 ml of 10⁻¹ dilution, three with 1 ml of 10⁻² dilution and three with 1 ml of 10⁻³ dilution. The tubes were incubated at 31 ± 1 °C for 48 hours and the contents were spread on Palcam agar plates. The tubes in which *Lm* colonies were obtained were considered as positive and the MPN was estimated using positive-negative combinations in the MPN tables.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Parallely, frankfurter sausages were also prepared with the standard packaging in the Viscofam equipment, as explained previously.

After skinning the sausages and removing the casing, they were inoculated with 100 µl of Lm to obtain a final concentration of 50 CFU/g, as described previously.

After the incubation period, each sausage was homogenized in the Stomacher and the Listeria count was done as explained previously.

Table I shows how Listeria growth was inhibited in the frankfurter sausages made with the casing that contained hop acids compared with those made with the standard casing.

Table I. Inhibition of *L. monocytogenes* in the sausages of Example I kept at 2°C

	<i>L.m.</i> (CFU/g sausage)					
	Day 0	2	7	15	30	70
Standard casing	33	110	320	3600	20000	2000000
Casing of the invention	33	18	34	400	580	87000

Example II.

A hydrogenated extract of commercial hops of S. S. Steiner, Inc., which contained 10% tetrahydrogenated hop alpha acids, was mixed with 40% glycerin. The resulting solution was sprayed on the inside of a cellulosic casing during the gathering process; frankfurter sausages were made with this casing and compared with frankfurter sausages made with a standard casing. The estimated final concentration of hydrogenated derivatives of hop acids was 55 ppm relative to the frankfurter sausage weight.

Inoculated sausages were prepared as described in Experiment I.

Listeria growth was inhibited in the frankfurter sausages made with

THIS PAGE BLANK (USPTO)

casing containing hop acids, compared with the frankfurter sausages made with the standard casing, as shown in Table II.

Table II. Inhibition of *L. monocytogenes* in the sausages in Example II maintained at 2°C

5

	<i>L.m.</i> (CFU/g sausage)				
	Day 0	2	7	15	34
Standard casing	109	170	66000	8600000	1400000000
Casing of the invention	109	29	14000	240000	340000000

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Claims

1. The use of hop extract, hydrogenated hop extract, hop alpha acids, hop beta acids, hydrogenated hop acids, derivatives of hop acids or their resins, each separately or in combinations of two or more, applied on the inside surface of a cellulosic casing used in sausage production to prevent the appearance and growth of gram-positive bacteria in these meat products.
2. The use according to claim 1, to prevent the appearance and growth of bacteria of the genus *Listeria* in these meat products.
3. Cellulosic casing for meat products coated internally with a solution that contains at least one of the following: hop extract, hydrogenated hop extract, hop alpha acids, hop beta acids, hydrogenated hop acids and derivatives of hop acids or their resins, characterized because the solution has no additional antimicrobial agents other than plant extracts.
4. Meat product produced using a cellulosic casing according to claim 3.
5. Meat product according to claim 4 characterized because it contains 50 to 500 ppm of hop extract, hydrogenated hop extract, hop alpha acids, hop beta acids, hydrogenated hop acids, derivatives of hop acids or their resins or their mixtures, separately or the combination of two or more of them.
6. Meat product according to claim 4 characterized because it contains 50 to 100 ppm of hop extract, hydrogenated hop extract, hop alpha acids, hop beta acids, hydrogenated hop acids, derivatives of hop acids or their resins, each separately or combinations of two or more.
7. Meat product according to claims 4-6 characterized because they contain any meat composition, which may or may not have been submitted to an additional smoking process.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8. Method to apply to a meat product a solution that contains at least one of the following components: hop extract, hydrogenated hop extract, hop alpha acids, hop beta acids, hydrogenated hop acids and derivatives of hop acids or their resins, which does not contain additional antimicrobial agents other than plant extracts. The method is characterized by consisting of the following steps:

a) applying a solution to the inside of a cellulosic casing

b) filling the cellulosic casing with meat paste,

c) heating and optionally smoking the meat product prepared in step a) so that the solution is transferred to the meat surface, and

d) optionally removing the cellulosic casing of the meat product.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SUMMARY

ANTIMICROBIAL CASING

5 The invention corresponds to application of a hop extract, hydrogenated hop extract, hop alpha acids, hop beta acids, hydrogenated hop acids, derivatives of hop acids or their resins, each separately or in combinations of two or more, on the inside surface of a cellulosic casing used in sausage manufacture to prevent the appearance and growth of gram-
10 positive bacteria especially of the genus *Listeria* in these meat products. Similarly, the invention also provides a cellulosic casing for meat products coated internally with a solution of the hop derivatives mentioned; and a meat product produced using this cellulosic casing. Finally, the invention provides a method to apply this solution to a meat product.

15

THIS PAGE BLANK (USPTO)